

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi dan dan Morfologi Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack)

Menurut *Angiosperm Phylogeny Group* (2003) Menyatakan kedudukan taksonomi *E. longifolia* adalah sebagai berikut: Dunia : Plantae, Divisi : Magnoliophyta, Kelas : Magnoliopsida, Ordo : Sapindales, Famili : Simaroubaceae, Genus : *Eurycoma*, Jenis : *Eurycoma longifolia* Jack.

Eurycoma longifolia Jack umumnya berbentuk semak atau pohon kecil yang tingginya jarang mencapai 10 meter, namun ada juga yang tingginya lebih dari 15 meter dan diameter mencapai 15 cm. Daunnya majemuk menyirip, jumlahnya ganjil, panjang 0,3-1 meter dengan anak daun berjumlah 20-30 pasang, berbentuk oblong, bergelombang, warna anak daunnya hijau tua berukuran 5-25 cm, pinggirannya bergelombang, tangkai daunnya berwarna coklat kehitaman. Batang tumbuhan *E. longifolia* pada umumnya tidak bercabang, tetapi ada juga yang bercabang sedikit menyerupai payung dengan kedudukan daunnya melingkar (*rosette*), batangnya berwarna coklat keabuan-abuan dan licin. Buah tumbuhan *E. longifolia* mempunyai ukuran 1,25 cm, berbentuk oblong, ketika masak warnanya menjadi kuning kemudian memerah. Bunganya bersifat dioceus dan monoceous berwarna merah jingga, lebar bunga 0,6 cm, berbulu halus dengan benjolan kelenjar diujungnya. Akar *E. longifolia* mempunyai warna coklat muda kekuningan yang tumbuh dengan lurus dan kekar membentuk akar tunggang. (Indonesia Botanic Garden (1998) *cit.* Susilowati (2008).

Eurycoma longifolia Jack umumnya berbentuk semak atau pohon kecil yang tingginya mencapai 10 meter, namun ada juga yang tingginya lebih dari 15

meter dan diameter mencapai 15 centimeter. Berdasarkan sifat-sifatnya *E. longifolia* dikelompokkan bersama dengan marga *Quassia*, *Picrasma*, *Brucea* dan *Soulamea* dalam suku *Simarubaceae* yang terdiri dari tumbuhan yang mengandung substansi pahit (*bitter plant*), (Susilawati, 2010).

2.1.1 Ekologi dan Habitat *Eurycoma longifolia* Jack

Eurycoma longifolia Jack merupakan salah satu tanaman obat asal hutan yang masih belum banyak dikembangkan padahal tanaman ini memiliki banyak khasiat. *E. longifolia* memiliki beberapa nama lokal antara lain: *bidara laut*, *mempoleh* (Bangka), *widara putih* (Jawa), *penawar pahit* (Melayu), *besan* (Sumatera Utara), *pasak bumi* (Kalimantan), *tongkat ali*, *bedara merah*, *bedara putih* (Malaysia), dan *tung saw*, *phiak*, *hae pan chan* (Thailand) (Indonesia Botanic Garden, 1998 cit Susilowati, 2010).

Habitat *E. longifolia* merupakan hutan tropis dengan curah hujan yang cukup tinggi dan tanahnya tidak tergenang air, datar tetapi lebih disukai kondisi tanah yang miring, aerasi baik atau banyak mengandung pasir. Pada tingkat semai, tumbuhan ini banyak dijumpai mengelompok di bawah tajuk hutan. Tumbuhan muda tidak menyukai cahaya langsung yang terlalu banyak, tetapi memerlukan cahaya langsung sejak tumbuhan memasuki tingkat pohon (Herianto, 2006).

2.1.2 Pemanfaatan *Eurycoma longifolia* Jack

Tumbuhan *E. longifolia* telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat tradisional untuk keperluan penyembuhan berbagai penyakit. Beberapa penelitian farmakologis yang telah dilakukan untuk mengetahui manfaat

E.longifolia diantaranya: Afrodisiak, Antihyperglycaemic, anti malaria, anti kanker anti HIV, anti leukemia (Nurhanan *et al.*, 2005),

Beberapa kajian etnobotanis telah dilakukan terhadap tumbuhan *E.longifolia* pada masing-masing bagian tumbuhan. Akar tumbuhan ini dicampur dengan tumbuhan obat lain seperti kayu manis dan digunakan untuk tonik penyehat di Sabah. Daun *E.longifolia* yang muda dan buah *E.longifolia* digunakan sebagai obat desentri; demikian juga bunga dan buah *E.longifolia* di Vietnam digunakan sebagai obat desentri (Susilawati, 2010).

Di Malaysia kulit akarnya digunakan juga sebagai penawar demam, penyembuh luka-luka di gusi atau gangguan cacing serta tonikum setelah melahirkan. Kulit batang digunakan untuk koagulan darah setelah melahirkan, sedangkan di Kalimantan dan Sabah kulit batang digunakan untuk mengobati nyeri pada tulang. Daun *E.longifolia* yang muda dapat dimakan untuk pengobatan sakit perut. Bunga dan buah *E.longifolia* di Vietnam telah dimanfaatkan sebagai obat desentri. Menurut sifat fisik, mekanis dan keawetan, kayu *E.longifolia* memiliki berat jenis 0,65, kelas awet 4-5, dan kelas kuat II. Kayu golongan ini dapat digunakan untuk keperluan konstruksi dan mebel (Tanaman Obat Tradisional, 2011).

2.2 Perbanyakan Secara *In-Vitro*

Perbanyakan secara *in-vitro* atau yang lebih dikenal dengan kultur jaringan adalah suatu metode penanaman protoplas, sel, jaringan, dan organ pada media buatan dalam kondisi *aseptic*, penggunaan media kultur buatan dengan kandungan nutrisi lengkap dan ZPT (Zat Pengatur Tumbuh) serta kondisi ruang kultur yang suhu dan pencahayaannya terkontrol sehingga dapat beregenerasi menjadi

tanaman lengkap. Salah satu aplikasi kultur jaringan yang telah dikenal secara meluas dan telah banyak diusahakan untuk tujuan komersial adalah perbanyakan tanaman (Mariska dan Deden, 2003; Yusnita, 2004).

Perbanyakan dengan kultur jaringan atau disebut juga dengan *in-vitro culture*, merupakan suatu teknik perbanyakan vegetatif yang banyak digunakan karena memiliki beberapa keuntungan antara lain, tingkat mutipikasi yang tinggi, seragam secara genetik, memiliki sifat seperti induknya, bibit dapat dihasilkan setiap waktu, tidak tergantung pada musim, dapat menghasilkan bibit yang bebas penyakit, bahan tanaman yang dibutuhkan sedikit, tidak merusak pohon induk, dan tempat untuk produksi bibit yang relatif sempit (Rosmaina, 2007).

Kebutuhan bibit yang besar ini seringkali tidak dapat dipenuhi dengan hanya menggantungkan pada perbanyakan tanaman secara generatif karena adanya keterbatasan-keterbatasan, antara lain musim berbuah yang terbatas waktunya, sifat-sifat keturunan yang variatif, membutuhkan tempat yang luas, dan keterbatasan jumlah benih yang dihasilkan Untuk itu maka diperlukan adanya alternatif perbanyakan (Nursyamsi, 2010).

2.3 Kultur Jaringan *Eurycoma longifolia* Jack

Salah satu yang meneliti perbanyakan tanaman *Eurycoma longifolia* Jack adalah Siregar *et al.*(2006) tentang pertumbuhan dan akumulasi alkaloid dalam kalus dan suspensi sel *E. longifolia* sedangkan eksplan yang digunakan daun, petiol, dan batang dari perkecambahan *in-vitro* digunakan sebagai eksplan untuk inisiasi dan penghasilan kalus. Kalus dari eksplan petiol menghasilkan biomassa yang paling tinggi dalam medium MS + 43.01 μ M NAA + 8.88 μ M BAP dengan sifat kalus yang padat dan berwarna kuning kehijauan. Selain itu, Optimalisasi

aplikasi auksin yang cocok dalam bandel hutan tanaman berkayu dari *E. longifolia* (Tongkat Ali) untuk induksi kalus, dari percobaan menunjukkan bahwa menggunakan 2,4-D menunjukkan hasil yang paling tertinggi (Mahmood *et al.*, 2010). Kemudian Salamah *et al.* (2009) yang mengisolasi *eurycomanone* akar *E. longifolia* serta uji anti-angiogenik. Siregar (2008) juga meneliti tentang pengaruh sitokinin eksogen dan sukrosa terhadap produksi biomassa dan alkaloid *Canthinone* di dalam kultur suspensi sel pasak bumi *E. longifolia*.

Kultur kalus merupakan kultur sekumpulan sel yang tidak terorganisir, hanya sel-sel parenkim yang berasal dari berbagai bahan awal. Penelitian pembentukan kalus pada jaringan terluka pertama kali dilakukan oleh Sinnott pada tahun 1960. Pembentukan kalus pada jaringan luka dipacu oleh zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin endogen. Secara *in-vitro* (Dewi *et al.*, 2012). Pembentukan dan pertumbuhan kalus dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya komposisi media tumbuh. Setiap jenis tanaman memiliki respons yang berbeda terhadap zat pengatur tumbuh yang diberikan (Lina *et al.*, 2013).

Adapun beberapa peneliti yang berhasil mengkultur kalus dari petiol *E. longifolia* diantaranya, Hussein *et al.* (2005) mengatakan eksplan tangkai daun menunjukkan bahwa tingkat maksimum pembentukan kalus dapat dicapai dalam 2,0 mg L⁻¹ (b/v) dari 2,4-D dan penggunaan kinetin 0,5-3,0 mg L⁻¹ (b/v) dan dikombinasikan dengan 2,4-D 1,0 mg L⁻¹ (b/v), mampu menginduksi pembentukan kalus embrio somatik pada eksplan *E. longifolia*, hal ini juga dilaporkan oleh Mahmood *et al.* (2010) penggunaan 2,4-D dan picloram pada 4,0 mg L⁻¹ ditemukan media yang paling efektif untuk induksi kalus (78,33%) menggunakan eksplan tangkai daun.

Induksi kalus manggis (*Garcinia mangostana* L.) melalui kultur *in vitro* (Satria *et al.*, 1999), Induksi kalus daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada beberapa kombinasi konsentrasi 6-Benzylaminopurine(BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) (Indah dan Ermavitalini, 2013), Pengaruh komposisi media dan sumber eksplan terhadap induksi kalus, Perkecambahan, dan Pertumbuhan Tunas Embrio Somatik Jarak Pagar (Anggraeni *et al.*, 2012), Kajian penggunaan berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap induksi kalus jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) secara *in vitro*.

2.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Kultur Jaringan

Kemampuan internal sel untuk berdediferensiasi disebut totipotensi. Kearah mana sel-sel tanaman dapat diinduksi untuk mengekspresikan totipotensinya, sangat bergantung pada sejumlah variable termasuk faktor eksplan, komposisi medium, zat pengatur tumbuh, dan stimulasi fisik, seperti cahaya, suhu, dan kelembaban Kartha (1984) *cit.* Zulkarnain (2009). Faktor-faktor tersebut sangat berkesinambungan, sehingga salah satu faktor tersebut tidak dapat dihilangkan agar diperolehnya tanaman yang diinginkan. Selain itu yang sering menjadi permasalahan adalah mendapatkan metode yang tepat untuk memperoleh pertumbuhan dan perkembangan yang optimal sehingga diperoleh tanaman lengkap (*planlet*) (Aryani, 2013).

a. Eksplan

Ekplan merupakan faktor penting yang menentukan keberhasilan program kultur jaringan. Dan untuk mendapatkan eksplan yang memenuhi standar dalam kultur jaringan ada beberapa hal yang harus diperhatikan diantaranya, genotip,

umur, dan kondisi fisiologis. Selain itu faktor yang mempengaruhi laju keberhasilan kultur jaringan namun bukan faktor utama dalam kultur jaringan yaitu ukuran eksplan. Eksplan yang berukuran kecil memiliki peluang yang rendah untuk menghasilkan variasi genetik, sedangkan bila ukurannya terlalu besar akan sulit didapatkan eksplan yang steril (Zulkarnain, 2009). Sedangkan menurut Mariska dan Deden (2003) eksplan adalah bagian tanaman yang akan dikulturkan. Eksplan dapat berasal dari meristem, tunas, batang, anter, daun, embrio, hipokotil, biji, rhizome, bulbil, akar atau bagian-bagian lain. Ukuran eksplan yang digunakan bervariasi dari ukuran mikroskopik ($\pm 0,1$ mm) sampai 5 cm.

b. Media Kultur

Keberhasilan dalam penggunaan metode kultur jaringan sangat tergantung pada media yang digunakan (Gunawan, 1987). Unsur-unsur yang penting dalam media tersebut adalah garam-garam anorganik, vitamin, zat pengatur tumbuh, sumber energi, dan karbon. Garam-garam anorganik terdiri dari unsur-unsur hara yang esensial. Unsur hara esensial adalah unsur hara yang diperlukan oleh tanaman untuk menyelesaikan siklus hidupnya, fungsi unsur hara tersebut tidak dapat digantikan oleh unsur yang lain, dan diperlukan dalam proses metabolisme tanaman sebagai komponen molekul anorganik atau sebagai kofaktor dalam reaksi enzim (Orcutt dan Nilsen, 2000).

Media kultur jaringan tanaman tidak hanya menyediakan unsur-unsur hara makro dan mikro, tetapi juga karbohidrat yang pada umumnya berupa gula untuk menggantikan karbon yang biasanya diperoleh dari atmosfer melalui fotosintesis (Gunawan, 1987). Gula yang digunakan sebagai sumber karbon misalnya sukrosa

atau glukosa (Santoso dan Nursandi, 2002). Konsentrasi sukrosa dalam media biasanya 2-4%.

Media kultur terdiri dari beberapa komponen, hara makro digunakan pada semua media, hara mikro hampir selalu digunakan tetapi ada beberapa yang hanya menggunakan besi atau besi-kelat. Vitamin-vitamin umumnya ditambahkan dalam jumlah yang bervariasi. Gula merupakan keharusan kecuali untuk tujuan yang sangat khusus, vitamin yang sangat sering digunakan adalah thiamine (vitamin B1) merupakan vitamin esensial, nicotinic acid (niacin) dan pyridoxine (vitamin B6). Asam amino dan N organik. Persenyawaan kompleks alamiah seperti air kelapa, ekstrak ragi, juice tomat, ekstrak kentang dan sebagainya. Buffer, terutama buffer organik, arang aktif, sering digunakan untuk menstimulir pertumbuhan akar, ZPT terutama auksin dan sitokinin. Zat pengatur tumbuh merupakan komponen yang sangat penting dalam media kultur jaringan, tetapi jenis dan konsentrasinya sangat tergantung pada jenis tanaman dan tujuan kulturnya. Bahan pemat, yang biasa digunakan adalah agar. Agar merupakan campuran polisakarida yang diperoleh dari beberapa spesies algae, dalam analisis agar mengandung unsur Ca, Mg, K dan Na.

Literatur lain menyebutkan bahwa media kultur adalah media steril yang digunakan untuk menumbuhkan sumber bahan tanaman menjadi bibit. Media kultur terdiri dari garam anorganik, sumber energi (karbon), vitamin, dan zat pengatur tumbuh. Selain itu, dapat pula ditambahkan komponen lain seperti senyawa organik dan senyawa kompleks lainnya (Mariska dan Deden, 2003).

Murashige and skoog atau yang biasa disingkat dengan MS, merupakan media dasar yang sering digunakan dalam kultur *in-vitro*. Media ini mempunyai

konsentrasi garam organik yang lebih tinggi dibanding media lain (Husni, 1997). Komposisi media *Murashige dan Skoog* mengandung unsur-unsur yang lebih lengkap sehingga digunakan pada hampir semua jenis kultur (Gunawan, 1987). Mardin (2002), juga menambahkan media MS merupakan media yang sangat luas pemakaiannya karena mengandung unsur hara makro dan mikro yang lengkap sehingga dapat digunakan untuk berbagai spesies tanaman. Lebih lanjut Marlina (2004), menyatakan bahwa media MS sering digunakan karena cukup memenuhi unsur hara makro, mikro dan vitamin untuk pertumbuhan tanaman. Perbanyakan tanaman jati pada media MS menghasilkan rata-rata tujuh tunas per sampel dan hasil ini lebih baik dibandingkan media yang lain (Herawan dan Husnaeni, 2001).

c. Zat pengatur tumbuh

Zat pengatur tumbuh pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara, yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan. Zat pengatur tumbuh dapat dibagi menjadi beberapa golongan yaitu golongan auksin, sitokinin, giberelin dan inhibitor. Zat pengatur tumbuh yang tergolong auksin adalah Indol Asam Asetat (IAA), Indol Asam Butirat (IBA), Naftalaen Asam Asetat (NAA) dan 2,4 Diklorofenoksiasetat (2,4-D). Zat pengatur tumbuh yang termasuk golongan sitokinin adalah Kinaetin, Zeatin, Ribosil dan Bensil Aminopurin (BAP). Sedangkan golongan giberelin adalah GA1, GA2, GA3, GA4, dan golongan inhibitor adalah fenolik dan asam absisik (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Zat pengatur tumbuh (ZPT) didefinisikan sebagai senyawa organik bukan nutrisi yang aktif dalam jumlah kecil (10^6 - 10^5 mM) yang disintesis pada bagian tertentu tanaman dan pada umumnya diangkut ke bagian lain tanaman

dimana zat tersebut menimbulkan tanggapan secara biokimia, fisiologis dan morfologis (Aryani, 2013). Menurut Gunawan (1998), Zat Pengatur Tumbuh adalah senyawa organik bukan nutrisi yang dalam konsentrasi rendah ($< 1 \text{ mM}$) mendorong, menghambat atau secara kualitatif mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Dua golongan zat pengatur tumbuh yang penting dalam kultur jaringan yaitu auksin dan sitokinin.

Literatur lain menyebutkan ZPT adalah salah satu bahan sintesis atau hormon tumbuh yang mempengaruhi proses pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan melalui pembelahan sel, pembesaran sel dan diferensiasi. Pengaturan pertumbuhan ini dilaksanakan dengan cara pembentukan hormon-hormon, mempengaruhi sistem hormon, pengrusakan, translokasi, atau dengan perubahan tempat pertumbuhan hormon (Susilowati, 2008). Berikut merupakan zat pengatur tumbuh yang sering digunakan yaitu sitokinin dan auksin.

1. Auksin

Auksin adalah sekelompok senyawa yang berfungsi merangsang pemanjangan sel-sel pucuk yang spectrum aktivitasnya menyerupai IAA (Indole-3-acetic acid) Zulkarnain, 2009). Seperti diketahui bahwa auksin adalah hormon tumbuhan yang diproduksi dari dalam tubuh tumbuhan, tetapi saat ini telah dapat dibuat secara sintetik. Fungsinya adalah untuk merangsang pertumbuhan kalus, merangsang pembesaran sel dan mengatur morfogenesis dari setiap tanaman (Marggy, 2010).

Salah satu jenis auksin yang sering digunakan dalam penelitian *kultur in vitro* khususnya penginduksian kalus yaitu 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). 2,4-D merupakan golongan auksin sintesis yang mempunyai sifat stabil,

karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan sel atau pemanasan pada proses sterilisasi (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Rahayu *et al.* (2003) mengatakan penambahan 2,4-D dalam media akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus.

Selain itu, 2,4-D merupakan ZPT yang paling sering digunakan pada kultur kalus karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan oragonogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus. Apabila dibandingkan dengan auksin lainnya seperti IAA, 2,4-D menunjukkan aktivitas yang lebih kuat (Indah dan Ermavitalini, 2013).

2. Sitokinin

Sitokinin adalah senyawa yang dapat meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tanaman serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Lina *et al.*, 2013). Menurut Karjadi *et al.* (2008) Sitokinin adalah senyawa turunan adenine dan berperan dalam pengaturan pembelahan sel dan morfogenesis. Menurut Zulkarnain (2009) dan Rabbiani *et al.* (2010) Sitokinin adalah senyawa yang dapat meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tanaman serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman. fungsi sitokinin lebih memicu pembentukan tunas dan pembelahan sel namun cenderung menghambat pembentukan akar, auksin cenderung memicu pembentukan kalus dan akar.

Sitokinin terbagi atas sitokinin alami yaitu 2iP (N6-2-Isopentanyl Adenin) dan Zeatin, dan sitokinin sintetik yaitu BAP (6-Benzyl Amino Purin). Sitokinin yang biasa digunakan adalah kinetin, zeatin, 2iP (N6-2-Isopentanyl Adenin), BAP (6-Benzyl Amino Purin), dan TDZ (*thidiazuron*) (Gunawan, 1988). Kinetin (6-

furfury amino purine) sitokinin yang berperan untuk pembelahan sel, kinetin juga aktif dalam pertumbuhan dan proliferasi kalus (Robbiani *et al.*, 2010).

Kinetin (*6-furfury amino purine*) adalah salah satu sitokinin yang berperan untuk pembelahan sel. Sitokinin bersama-sama dengan auksin akan memberikan pengaruh interaksi terhadap diferensiasi jaringan dalam kultur jaringan tanaman (Hendaryono dan Wijayani, 1994). dengan sitokinin (Benzyl Adenin ataupun kinetin) akan meningkatkan proses induksi kalus (Litz *et al.*, 1995).

d. Lingkungan Tumbuh

Sejumlah faktor lingkungan tumbuh yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan kultur jaringan adalah suhu, cahaya, karbondioksida, oksigen, etilen, dan kelembaban (Zulkarnain, 2009).

Keberhasilan dalam kultur *in vitro* juga dipengaruhi oleh lingkungan tumbuh seperti suhu, pH, dan cahaya. Tingkat kemasaman (pH) media harus diatur supaya tidak mengganggu fungsi membran sel dan pH sitoplasma. Sel-sel tanaman membutuhkan pH yang sedikit asam berkisar antara 5,5-5,8. Apabila pH dalam media terlalu rendah atau tinggi, akan menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan menjadi terhambat (Davey dan Anthony, 2010).